

11. Publication number: 0412883A1

# EUROPEAN PATENT APPLICATION

12.

21. Registration number: 90402224.1

51. Int. Cl.<sup>5</sup>: C12Q 1/68

22. Registration date: 08-02-90

30. Priority: 08-11-89 FR 8910802

43. Application publication date:  
Bulletin 02-13-91 91/07

64. Designated contracting states:  
AT BE CH DK ES FR GB GR IT  
LI LU NL SE

71. Applicant: BERTIN & CIE  
Zone Industrielle P.O.BOX 3  
F-78373 Plaisir CEDEX (FRANCE)

71. Inventor: Cohen, Daniel  
5, rue Jeanne D'Arc  
F-94160 St. Mandé (FRANCE)  
Inventor: Dufau, Frédéric  
9, Hameau de Bois-Fontaine  
F-78170 La Celle-St.-Cloud  
(FRANCE)

Inventor: Hache, Jean  
3, allée de l'Épée  
F-78960 Voisins le Bretonneux  
(FRANCE)

Inventor: Jeanpierre, Marc  
94, rue Lecourbe  
F-75015 Paris (FRANCE)  
Inventor: Ginot, Frédéric  
3, rue des Ébisoirs  
F-78370 Plaisir (FRANCE)  
Inventor: Martinez, Marie-Christine  
2, rue du Colonel Candelot  
F-92340 Bourg-la-Reine (FRANCE)  
Inventor: Roussel, Brigitte  
63, voie des Sculpteurs, Résidence  
des Platanes  
F-92800 Puteaux (FRANCE)  
Inventor: Trotton, Agnès  
12, place Boussergent  
F-75101 Paris (FRANCE)

74. Legal representative: Orès, Bernard  
et al  
Cabinet ORES  
6, avenue de Messine  
F-75008 Paris (FRANCE)

54. Fast screening and/or identification of a single base on a nucleic acid sequence, including applications.

57. This method is characterized by: (1) hybridization of the sequence upon which the base to be identified is located using a nucleotide that is sufficiently elongated; (2) initiating synthesis of the template strand of the hybrid generated above in (1) with this nucleotide functioning as catalyst in the presence of a polymerase without exonuclease 3'5' action and at least one modified nucleotide base; (3) screening for the nucleotide blocker base that is binding using any appropriate method.

Application: diagnosis of genetic diseases.

EP 0 412 883 A1

**FAST SCREENING AND/OR IDENTIFICATION OF A SINGLE BASE ON A NUCLEIC ACID SEQUENCE, INCLUDING APPLICATIONS.**

The following invention is related to screening and/or identification of a single base on a nucleic acid sequence, including applications, in particular for the diagnosis of genetic diseases and for checking hybridization.

Nucleic acid hybridization has been used to identify and establish the presence of nucleic acids. Hybridization is based on complementary base pairing. When complementary single strand nucleic acids are incubated together, the single strand nucleic acids in question pair to create a double strand hybrid molecule. The capacity of single strand DNA or RNA to create a structure composed of a complementary nucleic acid sequence is used as a method of both analysis and diagnosis. Availability of both radioactive triphosphate nucleotides with specific and significant activity, and  $^{32}\text{P}$  DNA labeling with enzymes functioning as polymerase (e.g.;  $T_4$  kinase), have made it possible to identify, isolate and characterize numerous nucleic acid sequences of biological significance.

Hybridization is a significant criteria for screening particular nucleic acid sequences as in the following:

- human or animal genetic diseases where a hereditary modification of the genetic base invokes morbid consequences (either through insertion, deletion or point mutation of a particular sequence);
- cancer where rearrangements of DNA genomes are observed;
- infections where foreign genomes are screened such as those of micro-organisms (e.g.; bacteria, fungi and viruses);
- identification of individuals in general;
- forensic medicine (e.g.; paternity and filiation);
- the agri-food products domain (e.g.; crops and sanitary control).

However, hybridization as a diagnostic tool may be limited due to the difficulty of its implementation (unwieldy techniques) or due to the absence of specificity (operational protocol).

Chemical study of hybridization has uncovered the effects of the concentration of each nucleic strand implicated, their lengths, base compositions, temperature, pH, ionic force and contextual viscosity.

Temperature for example is crucial and must be kept below fusion temperature ( $T_m$ : temperature where 50 % of sequences occur as double strands). In a solution, optimal hybridization temperature is  $25^{\circ}\text{C}$  below  $T_m$  for a probe of 150 nucleotides and slightly lower for shorter probes.

Thus, in general, when the goal is screening mutations on a single base, two kinds of probes may be used, depending on the case: nucleic acid probes generally above 150 nucleotides, termed long probes, and short nucleic acid probes generally between 17 and 24 nucleotides. When a mutation occurs where it can be recognized by a specific enzyme, termed restriction enzyme, Southern's technique may be used: this involves stages of DNA isolation, restriction enzyme digestion, gel electrophoresis, transfer to a filter and hybridization using a long probe related to the mutation area; following wash out and autoradiography, analysis of fragment size allows to confirm or reject the presence of mutations. The very unwieldy procedure requires that the mutation be dependent on a restriction area. When this is not the case, a short oligonucleotide probe with 17 to 24 nucleotides may be synthesized where the center corresponds to the mutation that is to be screened. By selecting appropriate hybridization and rinsing conditions (specific to each system), hybridization may be achieved using a labeled oligonucleotide only in cases of perfect homology (a single nucleotide difference, at the mutation site in particular, creates destabilization of the hybridization).

However, all of these methods present a number of disadvantages:

- difficulty of sustaining temperature conditions so as to obtain appropriate hybridization;
- potential compulsory presence of a restriction site;
- blotting of the nucleic acid on a filter (Southern blot).

The American patent AMERSHAM # 4,656,127 has made it possible to circumvent some of these disadvantages, in particular with respect to screening mutations where no restriction enzyme cleavage sites are present.

This American patent # 4,656,127 describes a screening method for the mutation of a specific nucleotide base in a fragment of (DNA or RNA) nucleic acid that is targeted by:

- (a) hybridization of a target sequence probe to create a hybrid nucleic acid in which the tip of the probe is hybridized next to the specific nucleotide base;
- (b) mixing of the hybrid with a nucleotide derivative under conditions appropriate for elongating the probe, so as to promote junction of the nucleotide derivative with the probe tip, only when the specific base of the sequence corresponds (or does not correspond) to the mutation that is to be screened, as probes related to this derivative are resistant to digestion under particular conditions;

- (c) digestion of the hybrid via exonuclease under conditions such that the double strand fragment is slowly digested, probe tip first, unless the tip in question has been connected with the nucleotide acid;
- (d) elimination of portions of the probe that are no longer hybridized with the nucleic acid chain;
- (e) and screening for a mutation of the specific nucleotide base in the target sequence by screening for the probe, or its absence, following digestion.

This method implies use of a nucleotide derivative with specific properties, in addition to the probe, and consequently subsumes many steps. Additionally, it requires filter blotting of the nucleic acid, as well as labeling (of the probe or the nucleotide derivative).

Thus, in the invention herein, the goal has been to provide an identification procedure for a specific nucleotide base, that is both fast and easy to implement, and that responds better to the demands of practice than previous state of the art, especially since this procedure does not necessitate complex operational protocols (i.e.; neither DNA blotting, nor probe labeling) while it applies to screening of specific nucleic acid sequences for genetic diseases, cancer, infections, human, animal or plant identification.

The goal of the invention, herein, is screening and/or identification of a specific nucleotide base found on a nucleic acid sequence, and is characterized as follows:

- (1) hybridization of the sequence on which the base to be identified is found using a nucleotide of sufficient length to enable appropriate hybridization where, regardless of reaction temperature, the nucleotide hybridizes with the target sequence so that the 3' tip is next to the nucleotide base requiring screening and/or identification;
- (2) initialization of the synthesis of the template strand generated with the hybrid in (1), with this nucleotide functioning as catalyst in the presence of:
  - a polymerase without exonuclease 3' 5' action and
  - at least one modified nucleotide base, that can bind with the catalyst extension product, with this binding blocking elongation of the extension;
- (3) screening for the nucleotide blocker base using any appropriate method, with this screening allowing for identification of the specific template nucleotide base found on the target sequence to be analyzed.

In the invention herein, nucleotide refers both to an oligonucleotide with 10 to 50 bases and to a nucleotide with more than 100 bases.

According to one advantageous implementation of such a method, the nucleotide blocker bases are dideoxynucleotides.

According to another advantageous implementation of such a method, the nucleotide blocker bases are labeled appropriately and specifically with a marker selected from radioactive substances, enzymes, chemical chromophore fluorescent products, or chemiluminescent products and appropriate antibodies.

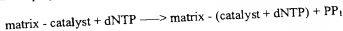
According to an advantageous provision of this implementation, the marker may be identical or different for each of the nucleotidic blocker bases.

According to a modality of this provision, when the four nucleotide blocker bases are differentially labeled, screening of the four blocker nucleotides is advantageously simultaneous.

According to another advantageous implementation of this method, when the four blocker bases are labeled with identical markers, or when they are unlabeled, screening for the four nucleotide blockers occurs sequentially and/or separately.

According to an advantageous provision of this mode of implementation, the pyrophosphate created during polymerization may be appropriately screened.

This means that polymerization generates production of a pyrophosphate as follows:



By measuring the pyrophosphate in each of the reaction tubes, it is possible to determine for which of the bases polymerization has occurred.

According to another advantageous provision of this mode of implementation each of the labeled nucleotide bases may be screened.

This means that each reaction tube contains, in this case, a single labeled nucleotide base, the remaining three not having been labeled; measurement of the labeled base (via fluorescence, radioactivity, etc.) allows determining for which of the bases polymerization has occurred, unbound and unlabelled bases having been eliminated via wash out.

This invention also presents the advantage of allowing for specification of operational conditions, separately from the nucleotide bases to be identified while avoiding filter blotting of the nucleic acid.

The invention, herein, also pertains to a ready to use kit, or diagnostic set, for implementing procedures, which is characterized, in addition to appropriate amounts of buffering substances and suitable agents, as follows:

- appropriate amounts of a nucleotide (used as catalyst) capable of hybridizing with the target sequence so that its 3' tip is next to the specific nucleotidic base to be screened;

- appropriate amounts of four modified nucleotide bases ready for binding with the catalyst extension product while blocking elongation of the extension; and

- appropriate amounts of a polymerase, without 3'5' exonuclease.

According to an advantageous use of this kit, or diagnostic set, the modified nucleotide bases are dideoxynucleotides (ddTTP, ddGTP, ddATP, ddCTP).

According to another advantageous use of this kit, or diagnostic set, the modified nucleotide bases are labeled appropriately and specifically using radioactive substances, enzymes, chemical chromophore fluorescent products or chemiluminescent products with appropriate antibodies.

According to another advantageous use of this kit, or diagnostic set, there are also appropriate buffer amounts for measurement of the pyrophosphate.

In addition to the preceding provisions, this invention subsumes additional provisions that are outlined in the following description.

This invention may be better understood in light of the following description where examples of implemented procedures, subsumed by this invention, are presented.

It should be noted, however, that the following exemplification is only an illustration of the object of this invention, and that it does not constitute limitations of any kind.

**Example 1: Diagnosis of sickle cell disease using the procedure of this invention (measurement of fluorescent dideoxynucleotides).**

Sickle cell disease, or sickle cell anemia, is caused by mutation of one of the exons of the  $\beta$  coding gene for the hemoglobin (Hb)  $\beta$  chain. This mutation, involving substitution of an adenine (A) with a thymine (T), modifies the codon GAG that translates into a glutamic acid (in G position) in normal Hb, into a GTG codon, that translates into a valine in abnormal Hb (HbS). The DNA used in this example corresponds to an amplified single strand DNA sequence.

**a) Blocking of amplification catalysts**

For each DNA matrix mix in a microcentrifuge tube:

- 100 ng of DNA (amplified single strand)
- 7  $\mu$ l Sequenase agent 5X (= Tris-HCl pH 7.5, 200 mM, NaCl, 250 mM;  $MgCl_2$  100 mM)
- $H_2O$  qsp 22  $\mu$ l
- agitate with a vortex and centrifuge promptly
- incubate in a water bath at 95°C for 2 minutes
- promptly remove and place in a water bath at 37°C for 10 minutes
- prepare a buffer for the DNA sample consisting of:
  - 2.5  $\mu$ l DTT 0.1 M
  - 1  $\mu$ l of a mixture containing ddNTP diluted 1:400 (ddTTP: 112  $\mu$ M; ddGTP: 1.12  $\mu$ M; ddATP: 3.36  $\mu$ M; ddCTP: 8.96  $\mu$ M); and

- H<sub>2</sub>O qsp 6.5 µl
- Sequenase 1 µl (3 units)
- remove tubes from the water bath, and promptly centrifuge
- add buffer, and stir,
- place tubes in a water bath at 37° C for 5 minutes,
- remove tubes, and place them in ice.

#### b) Elimination of excess cold dideoxynucleotides

Centricon 3 or 10 (Amicon) microseparation systems are used as they allow, via membrane filtration by accelerated centrifuge, retaining molecular specimens with a molecular weight above 3 000 to 10 000 Daltons (a nucleotide, for example, corresponds to 300 D and a 20 matrix synthesized oligonucleotide corresponds to 6 600 D).

- place the reacting volume arising out of a) in a "Centricon" 3 or 10 and dilute if necessary.
- centrifuge to less than 5 000 g following manufacture guidelines to recover minimal volume,
- reverse the "Centricon" system
- centrifuge to recover the reacting volume
- bring volume back to 12 µl.

#### c) Microsequencing (procedure pertaining to the invention)

For each DNA tube, add to the 12 µl:

- 15 ng of oligonucleotide 5' CATGGTGACCTGACTCCTG 3' (OA) corresponding to the sequence that ends next to the mutation
- 7 µl Sequenase 5X agent as specified in a) above and proceed as for a); then prepare a buffer for each sample using:
  - 2.5 µl DTT 0.1 M
  - 1 µl of a mixture diluted to 1:400 of fluorescent ddNTP (ddTTP: 112µM; ddGTP: 1.12µM; ddATP: 3.36µM; ddCTP: 8.96µM). Fluorescent dideoxynucleotides are marketed by Du Pont (Genesis<sup>M</sup> 2000 DNA Analysis System);
- H<sub>2</sub>O qsp 6.5 µl
- Sequenase 1 µl (3 units)
- remove tubes from the water bath, promptly centrifuge,
- add buffer, and stir
- place tubes in a water bath at 37° C for 5 minutes
- remove tubes, and place them in ice.

#### d) Washing out excess fluorescent dideoxynucleotides

- place samples on a Sephadex G50 column
- recover elutes.

#### e) Screening

Screening occurs for each of the samples following electrophoretic migration and stimulation, using a laser for example. Signals are analyzed with a fluorometer.

Distributions, a (control) and b (patient) as shown in Figure 1 allow screening for the position of a potential mutation, with binding of ddATP in -a- for a healthy individual and binding of ddTTP in -b- for the homozygous individual.

**Example 2: Microsequencing of a base on a nucleic acid sequence (Bacteriophage M13 mp8 DNA)**

**a) Initial materials**

Single strand bacteriophage M13mp8 DNA  
Synthesized oligonucleotide termed Universal Primer of the sequence:  
3' TGACCGGCAGCAAAATG5'. The first base for binding on the catalyst in the 5' → 3' direction is a G.

**b) Procedures**

Procedures are equivalent to procedures for screening point mutations beginning with step c in example 1. Steps a and b are unnecessary, since DNA of the phage M13 is not contaminated with oligonucleotides.

A variation of procedures follows:

- 3 µg single strand DNA M13
- 15 ng oligonucleotide universal primer
- 7 µl Sequenase 5X buffer
- H<sub>2</sub>O qsp 22µl

Screening reveals binding of a dideoxy GTP on the primer, which corresponds to expectations, as in figure 2 showing results obtained with two different ddNTP solutions (1:200) (a) and (1:400) (b).

As evidenced in the above, this invention is clearly not limited to the implementations, realizations and applications that have been explicitly detailed; rather it embraces all the variations that technicians can conceive of in this domain, without falling short of the framework and scope of this invention.

**Claims**

1) Procedure for screening and/or identification of a specific nucleotide base located in a nucleic acid sequence and characterized by:

- (1) hybridization of the sequence upon which the base to be identified is located, using a nucleotide of sufficient length to allow for correct hybridization, regardless of reaction temperature, with the nucleotide hybridizing on the target sequence so that its 3' tip is next to the specific nucleotide base to be screened and/or identified;



(2) initiating synthesis of the template strand of the hybrid generated above (1) - with this nucleotide functioning as catalyst in the presence of

- a polymerase without exonuclease 3'5' action and
- at least one modified nucleotide base that can bind to the catalyst's extension product, with binding blocking the elongation of the extension;

(3) screening the nucleotide blocker base that is binding using any appropriate method, with screening allowing for identification of the specific complementary nucleotide base present on the target sequence that is the object of the analysis.

2 ) Procedure according to Claim No.1, where blocker nucleotide bases are didesoxynucleotides.

3 ) Procedure according to Claim No. 1 or Claim No. 2, where blocker nucleotide bases are appropriately labeled, in particular with a marker that has been selected from radioactive substances, enzymes, chemical chromophore fluorescent products or chemiluminescent products and appropriate antibodies.

4 ) Procedure according to Claim No. 3, where markers are identical or different for each of the blocker nucleotide bases.

5 ) Procedure according to Claim No. 4, where resulting from differential labeling of the four blocker bases, screening of the four blocker nucleotides is advantageously simultaneous.

6 ) Procedure according to any one of Claims No. 1 through No. 4, where resulting from identical labeling of the four blocker bases or non-labeling, screening of the four nucleotides occurs either sequentially and/or separately.

7 ) Procedure according to Claim No. 6, where the pyrophosphate created during polymerization is measured in an appropriate manner, with this pyrophosphate measurement allowing determining for which of the bases polymerization has occurred.

8 ) Procedure according to Claim No. 6, where each of the labeled nucleotide blocker bases may be screened.

9 ) Ready to use kit, or diagnostic set, for implementation of the procedure according to any one of Claims No. 1 through 8 where, in addition to containing appropriate amounts of buffers and agents for implementation of procedures, it contains:

- appropriate amounts of a nucleotide used as catalyst, that can hybridize with the target sequence so that its 3' tip is next to the specific nucleotide base to be screened.
- appropriate amounts of the four modified nucleotide bases for binding with the catalyst's extension product while blocking elongation of that extension;
- and
- appropriate amounts of a polymerase without exonuclease 3'5' action.

10 ) Kit, or diagnostic set, according to Claim No. 9, where the modified nucleotide bases are didesoxynucleotides.

11 ) Kit, or diagnostic set, according to Claim No 9 or 10, where the nucleotide bases are labeled appropriately, in particular with markers selected from radioactive substances, enzymes, chemical chromophore fluorescent products or chemiluminescent products and appropriate antibodies.

12 ) Kit, or diagnostic set, according to any one of Claims No. 9 through 11, characterized in that it also includes appropriate reaction agents for the measurement of pyrophosphate.

13 ) Application of the procedure according to any one of Claims No 1 through 8 for screening of particular nucleic acid sequences related to diseases such as genetic diseases or cancer, infections, or allowing for identification of individual humans, animals or plants.



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) Numéro de publication: **0 412 883 A1**

(12)

# DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt: 90402224.1

(51) Int. Cl. C12Q 1/68

(22) Date de dépôt: 02.08.90

(30) Priorité: 11.08.89 FR 8910802

(42) Date de publication de la demande:  
13.02.91 Bulletin 91/07

(54) Etats contractants désignés:  
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Demandeur: BERTIN & CIE  
Zone Industrielle Boite postale 3  
F-78373 Plaisir Cédex(FR)

(72) Inventeur: Cohen, Daniel  
5, rue Jeanne d'Arc  
F-94160 St Mandé(FR)  
Inventeur: Dufau, Frédéric  
9, Hameau de Bois-Fontaine  
F-76170 La Celle-St-Cloud(FR)  
Inventeur: Hache, Jean  
3, allée de l'Epée  
F-78960 Voisins le Bretonneux(FR)

Inventeur: Jeanpierre, Marc  
94, rue Lecourbe  
F-75015 Paris(FR)  
Inventeur: Glnot, Frédéric  
3, rue des Ebisloires  
F-78370 Plaisir(FR)  
Inventeur: Martinez, Marie-Christine  
2 rue du Colonel Candelot  
F-92340 Bourg-la-Reine(FR)  
Inventeur: Roussel, Brigitte  
63 voie des Sculpteurs, Résidence les  
Platanes  
F-92800 Puteaux(FR)  
Inventeur: Troton, Agnès  
12 place Bonsergent  
F-75010 Paris(FR)

(74) Mandataire: Orès, Bernard et al  
Cabinet ORES 6, Avenue de Messine  
F-75008 Paris(FR)

(57) Procédé rapide de détection et/ou d'identification d'une seule base sur une séquence d'acide nucléique, et ses applications.

- (7) Ce procédé est caractérisé en ce que :
- (1) on hybride la séquence sur laquelle se trouve la base à identifier avec un nucléotide de longueur suffisante ;
  - (2) on débute la synthèse du brn complémentaire de l'hybride obtenu en (1), - ledit nucléotide servant d'amorce -, en présence :
    - d'une polymérase sans action exonucléase 3'5' et
    - d'au moins une base nucléotidique modifiée ;
  - (3) on détecte la base nucléotidique bloquante incorporée par tout moyen approprié.
- Application : diagnostic des maladies génétiques.

# PROCÉDE RAPIDE DE DETECTION ET/OU D'IDENTIFICATION D'UNE SEULE BASE SUR UNE SEQUENCE D'ACIDE NUCLEIQUE, ET SES APPLICATIONS.

La présente invention est relative à un procédé de détection et/ou d'identification d'une seule base sur une séquence d'acide nucléique, ainsi qu'à ses applications, notamment dans le diagnostic des maladies génétiques et dans le contrôle d'une hybridation.

L'hybridation d'acide nucléique a été utilisée pour étudier l'identité et établir la présence d'acides nucléiques. L'hybridation est basée sur l'appariement de bases complémentaires. Lorsque des acides nucléiques simple brin complémentaires sont incubés ensemble, lesdits acides nucléiques simple brin s'apparient pour former une molécule hybride double brin. La capacité de l'ADN simple brin ou de l'ARN à former une structure avec une séquence d'acide nucléique complémentaire est utilisée comme méthode d'analyse et de diagnostic. La disponibilité de nucléosides triphosphates radioactifs ayant une activité spécifique importante et le marquage de l'ADN au  $^{32}P$  en présence d'enzymes à fonction polymérase, par exemple la  $T_4$  kinase, a permis d'identifier, d'isoler et de caractériser de nombreuses séquences d'acides nucléiques d'intérêt biologique.

L'hybridation représente un critère important dans la détection de la présence de séquence d'acide nucléique particulières comme par exemple :

- dans les maladies génétiques humaines ou animales où une modification héréditaire du patrimoine génétique a des conséquences morbides (par insertion, délétion ou mutation ponctuelle d'une séquence particulière) ;
- dans les maladies cancéreuses, où des réarrangements de l'ADN génomique sont observés ;
- au cours des infections où l'on détecte la présence de génomes étrangers tels que celui des microorganismes (bactéries, champignons et virus par exemple) ;
- pour l'identification des individus en général : en médecine légale (paternité, filiation par exemple) ;
- dans le domaine agroalimentaire (plantes, contrôle sanitaire par exemple).

Cependant, l'hybridation comme outil de diagnostic peut être limitée par la difficulté de sa mise en oeuvre (techniques lourdes) ou par l'absence de spécificité de l'hybridation (protocole opératoire).

En effet, l'étude chimique de l'hybridation a mis en évidence l'influence de la concentration de chacun des brins d'acides nucléiques impliqués, de leurs longueurs, de leurs compositions en bases, de la température, du pH, de la force ionique, de la viscosité du milieu.

La température notamment, est critique et doit rester inférieure à la température de fusion ( $T_m$  : température à laquelle 50 % des séquences sont sous forme double brin). En solution, la température optimale d'hybridation est  $25^\circ C$  en dessous de la  $T_m$  pour une sonde de 150 nucléotides et légèrement plus basse pour les sondes plus courtes.

Ainsi lorsque l'on veut détecter une mutation portant sur une seule base, on peut généralement utiliser, selon les cas, deux types de sondes : des sondes d'acide nucléique dites longues, supérieures à 150 nucléotides en général, ou des sondes d'acide nucléique dites courtes entre 17 et 24 nucléotides en général. Si la mutation intervient dans un site reconnu spécifiquement par une enzyme dite de restriction, on peut utiliser la technique de Southern : celle-ci comporte les étapes d'isolement de l'ADN, de digestion par l'enzyme de restriction, d'électrophorèse sur gel, de transfert sur une membrane et d'hybridation à l'aide d'une sonde longue intéressant la région de la mutation. Après lavage et autoradiographie, l'analyse des tailles des fragments obtenus permet d'infirmer ou confirmer la présence de la mutation. Le procédé très lourd nécessite que la mutation intéresse un site de restriction. Si ce n'est pas le cas, on peut synthétiser une sonde courte oligonucléotidique de 17 à 24 nucléotides dont le centre coïncide avec la mutation que l'on veut détecter. En choisissant des conditions appropriées d'hybridation et de rinçage (spécifique de chaque système), on ne peut obtenir une hybridation à l'aide de l'oligonucléotide marquée qu'en cas d'homologie parfaite (une seule différence nucléotidique, notamment à l'endroit de la mutation, entraîne la déstabilisation de l'hybridation).

Cependant, ces différentes méthodes présentent un certain nombre d'inconvénients :

- conditions de température difficiles à maîtriser, pour obtenir une hybridation appropriée ;
- éventuellement présence obligatoire d'un site de restriction ;
- immobilisation de l'acide nucléique sur membrane (Southern blot).

Le Brevet Américain AMERSHAM n° 4 656 127, a permis de pallier certains de ces inconvénients, notamment en ce qu'il permet de détecter une mutation présente à un endroit ne présentant pas de site de clivage par une enzyme de restriction.

Ce Brevet Américain n° 4 656 127, décrit une méthode de détection de la mutation d'une base nucléotidique spécifique dans un fragment d'acide nucléique (ADN ou ARN) cible par

(a) hybridation d'une sonde avec la séquence cible pour former un hybride d'acide nucléique, dans lequel une extrémité de la sonde est hybridée de manière adjacente à la base nucléotidique spécifique ;

(b) mélange de l'hybride avec un dérivé nucléotidique dans des conditions appropriées à l'élongation de la sonde, de manière à permettre la jonction dérivé nucléotidique - extrémité de la sonde, seulement si la base spécifique dans la séquence cible est (ou n'est pas) la mutation à détecter, une sonde associée audit dérivé nucléotidique étant résistante à une digestion dans ces conditions particulières ;

(c) digestion de l'hybride par une exonuclease dans des conditions telles que le fragment double brin est progressivement digéré à partir de l'extrémité de la sonde à moins que ladite extrémité ait été mise en jonction avec ledit dérivé nucléotidique ;

(d) élimination des portions de la sonde qui ne sont plus hybridées à la chaîne d'acide nucléique ;

(e) et détection d'une mutation de la base nucléotidique spécifique dans la séquence cible par détection de la présence ou de l'absence de la sonde après digestion.

Ce procédé implique en particulier en plus de la sonde, l'utilisation d'un dérivé nucléotidique ayant des propriétés particulières et comporte de ce fait encore de nombreuses étapes. De plus, il nécessite, pour sa réalisation, une immobilisation de l'acide nucléique sur une membrane et également un marquage (de la sonde ou du dérivé nucléotidique).

La présente invention s'est en conséquence, donné pour but de pourvoir à un procédé d'identification d'une base nucléotidique spécifique, aisé et rapide à mettre en œuvre, qui répond mieux aux nécessités de la pratique que les procédés de l'Art antérieur, notamment en ce que le procédé conforme à l'invention ne nécessite pas un protocole opératoire complexe, c'est-à-dire ne nécessite ni immobilisation de l'ADN, ni marquage de la sonde, et s'applique à la détection de séquences d'acide nucléique particulières, notamment dans les maladies génétiques, les maladies cancéreuses, les infections, l'identification d'individus humains, animaux ou végétaux.

La présente invention a pour objet un procédé de détection et/ou d'identification d'une base nucléotidique spécifique présente sur une séquence d'acide nucléique, caractérisé en ce que :

(1) on hybride la séquence sur laquelle se trouve la base à identifier avec un nucléotide de longueur suffisante pour permettre une hybridation correcte, quelle que soit la température de réaction, ledit nucléotide s'hybride avec la sé-

quence cible, de manière à ce que son extrémité 3' soit adjacente à la base nucléotidique spécifique à détecter et/ou à identifier ;

(2) on débute la synthèse du brin complémentaire de l'hybride obtenu en (1), - ledit nucléotide servant d'amorce -, en présence :

- d'une polymérase sans action exonuclease 3'5' et

- d'au moins une base nucléotidique modifiée, de manière à être incorporable dans le produit d'extension de l'amorce, ladite incorporation bloquant l'élongation dudit produit d'extension ;

(3) on détecte la base nucléotidique bloquante incorporée par tout moyen approprié, ladite détection permettant d'identifier la base nucléotidique spécifique complémentaire présente sur la séquence cible à analyser.

On entend par nucléotide, au sens de la présente invention, aussi bien un oligonucléotide qui comprend de 10 à 50 bases qu'un nucléotide pouvant comprendre plus de cent bases.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, les bases nucléotidiques bloquantes sont des didésoxynucléotides.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, lesdites bases nucléotidiques bloquantes sont marquées de manière appropriée notamment par un marqueur choisi dans le groupe qui comprend des substances radioactives, des enzymes, des produits chimiques chromophores fluorescents ou chimiluminescents et des anticorps appropriés.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en œuvre, le marqueur est identique ou différent pour chacune des bases nucléotidiques bloquantes.

Selon une modalité de cette disposition, lorsque les quatre bases bloquantes sont marquées à l'aide de marqueurs différents, la détection des quatre nucléotides bloquants est avantageusement simplifiée.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, lorsque les quatre bases bloquantes sont marquées de manière identique ou bien lorsqu'elles ne sont pas marquées, la détection des quatre nucléotides bloquants est réalisée successivement et/ou séparément.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en œuvre, on détecte, de manière appropriée, le pyrophosphate formé lors de la réaction de polymérisation.

En effet, la réaction de polymérisation génère la production d'un pyrophosphate, comme suit :  
matrice - amorce + dNTP  $\rightarrow$  matrice - (amorce + dNMP) + PP<sub>i</sub>.

En mesurant le pyrophosphate dans chaque tube de réaction, il est possible de déterminer pour laquelle des bases une réaction de polymérisation

s'est produite.

Selon une autre disposition avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, on détecte chaque base nucléotidique marquée.

En effet, chaque tube de réaction contient, en ce cas, une seule base nucléotidique marquée, les trois autres ne l'étant pas : la mesure de la base marquée (par fluorescence, radioactivité...) permet de déterminer pour laquelle des bases une réaction de polymérisation s'est produite, les bases marquées non incorporées étant éliminées par lavage.

Le procédé conforme à l'invention a notamment l'avantage de permettre de définir les conditions opératoires, indépendamment de la base nucléotidique à identifier et de ne pas nécessiter d'immobilisation de l'acide nucléique sur une membrane.

La présente invention a également pour objet un kit ou coffret de diagnostic, prêt à l'emploi, pour la mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend outre les quantités convenables de réactifs et tampons adaptés à la mise en oeuvre du procédé :

- des quantités appropriées d'un nucléotide (servant d'amorce) capable de s'hybrider avec la séquence cible de manière à ce que son extrémité 3' soit adjacente à la base nucléotidique spécifique à détecter ;
- des quantités appropriées de quatre bases nucléotidiques modifiées de manière à être incorporables dans le produit d'extension de l'amorce tout en bloquant l'élongation dudit produit d'extension ;
- et
- des quantités appropriées d'une polymérase sans action exonucléase 3' 5'.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit kit ou coffret, les bases nucléotidiques modifiées sont des didésoxynucléotides (ddTTP, ddGTP, ddATP, ddCTP).

Selon une autre mode de réalisation avantageux dudit kit ou coffret, les bases nucléotidiques modifiées sont marquées de manière appropriée notamment par un marqueur choisi dans le groupe qui comprend des substances radioactives, des enzymes, des produits chimiques chromophores fluorescents ou chimiluminescents et des anticorps appropriés.

Selon encore une autre mode de réalisation avantageux dudit kit ou coffret, il comprend, en outre, des réactifs appropriés pour le dosage du pyrophosphate.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre.

L'invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

Exemple 1 : diagnostic de la drépanocytose par le procédé conforme à l'invention (mesure des didésoxynucléotides fluorescents).

La drépanocytose ou anémie falciforme est due à une mutation dans l'un des exons du gène  $\beta$  codant pour la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine (Hb). Cette mutation consistant en une substitution d'une adénine (A) par une thymine (T), modifie le codon GAG, traduit en un acide glutamique (en position G) dans l'Hb normale, en codon GTG, traduit en une valine dans l'Hb anormale (HbS). L'ADN qui a été utilisé dans cet exemple correspond à une séquence d'ADN amplifiée simple-brin.

#### a) Blocage des amorces d'amplification.

- \* mélanger dans un tube de microcentrifugation, pour chaque ADN matrice :
  - 100 ng d'ADN (simple-brin amplifié)
  - 7  $\mu$ l de tampon Sequenase 5X (= Tris-HCl pH 7,5, 200 mM ; NaCl, 250 mM ; MgCl<sub>2</sub>, 100 mM)
  - H<sub>2</sub>O qsp 22  $\mu$ l
  - \* agiter à l'aide d'un vortex et centrifuger rapidement
  - \* incuber au bain-marie à 95°C pendant 2 minutes
  - \* enlever vite et placer au bain-marie à 37°C pendant 10 minutes.
  - \* préparer le tampon de réaction pour un échantillon d'ADN, constitué de :
    - 2,5  $\mu$ l DTT 0,1 M
    - 1  $\mu$ l d'un mélange de ddNTP dilués au 1/400 (ddTTP : 112  $\mu$ M ; ddGTP : 1,12  $\mu$ M ; ddATP : 3,36  $\mu$ M ; ddCTP : 8,96  $\mu$ M) ; et
    - H<sub>2</sub>O qsp 6,5  $\mu$ l
    - Sequénase 1  $\mu$ l (3 unités)
    - \* enlever les tubes du bain-marie et centrifuger rapidement,
    - \* ajouter le tampon de réaction et mélanger,
    - \* placer au bain-marie à 37°C, pendant 5 minutes.
    - \* enlever les tubes et les placer dans la glace.

#### b) Elimination des didésoxynucléotides froids en excès

On utilise les systèmes de microséparation Centricron 3 ou 10 (Amicon) qui, par filtration sur membrane accélérée par centrifugation, permettent de retenir des espèces moléculaires de poids moléculaire supérieur à 3 000 ou 10 000 Dahons (par

exemple: un nucléotide correspond à 330 D et un oligonucléotide de synthèse de 20 mères correspond à 6 600 D).

- disposer le volume réactionnel issu de a) dans un "Centricon" 3 ou 10 et diluer si nécessaire,
- centrifuger à moins de 5 000 g en suivant les instructions du fabricant, de façon à récupérer un volume minimal,
- inverser le système "Centricon",
- centrifuger pour récupérer le volume réactionnel,
- ramener le volume obtenu à 12  $\mu$ l.

#### c) Microséquençage (procédé conforme à l'invention)

- \* Pour chaque tube d'ADN, ajouter aux 12  $\mu$ l :
  - 15 ng d'oligonucléotide 5' CATGGTGACCT-GACTCCTG 3' (OA), correspondant à la séquence s'arrêtant à la base adjacente à la position de la mutation
  - 7  $\mu$ l de Tampon Séquenase 5X tel que défini en a) ci-dessus et procéder comme dans a) ; puis
  - \* préparer le tampon de réaction constitué pour chaque échantillon de :
    - 2,5  $\mu$ l DTT 0,1 M
    - 1  $\mu$ l d'une dilution au 1/400ème d'un mélange de ddNTP fluorescents (ddTTP : 112  $\mu$ M ; ddGTP : 1,12  $\mu$ M ; ddATP : 3,36  $\mu$ M ; ddCTP : 8,96  $\mu$ M).
- Les didésoxynucléotides fluorescents sont vendus par Du Pont (Geneste™ 2000 DNA Analysis System) ;
- \* H<sub>2</sub>O qsp 6,5  $\mu$ l
- Séquenase 1  $\mu$ l (3 unités)
- enlever les tubes au bain-marie, centrifuger rapidement.
- \* ajouter le tampon de réaction, mélanger,
- \* placer au bain-marie à 37° C, pendant 5 mns.
- \* enlever les tubes et placer les dans la glace.

#### d) Lavage des didésoxynucléotides fluorescents en excès:

- \* passer les échantillons sur colonne de Sephadex G50.
- \* récupérer les éluats.

#### e) Détection

La détection se fait pour chaque échantillon après migration électrophorétique et excitation par une source telle qu'un laser. Le signal est analysé par un fluorimètre.

On obtient les courbes  $\lambda$  (témoin) et b (malade), comme visible sur la figure 1, qui permet

de détecter au niveau de la position correspondant à une éventuelle mutation, l'incorporation d'un ddATP en a, pour l'individu sain et pour l'individu malade homozygote en b. l'incorporation d'un ddTTP.

#### Exemple 2 : Microséquençage d'une base sur une séquence d'acide nucléique { ADN du bactériophage M13 mp8}.

##### a) Matériel de départ

- \* ADN simple brin de bactériophage M13mp8
- \* Oligonucléotide de synthèse dit Primer Universel de séquence : 3'TGACCGGCAGCAAAATG5'
- La première base incorporée sur l'amorce dans le sens 5'  $\rightarrow$  3' est un G.

##### b) Protocole

Le protocole est équivalent au protocole de détection de mutation ponctuelle à partir de l'étape c de l'exemple 1. Les étapes a et b sont inutiles, l'ADN du phage M13 étant non contaminé par des oligonucléotides.

En variante, le protocole est le suivant :

- 3  $\mu$ g d'ADN simple-brin M13
- 15 ng d'oligonucléotide primer universel
- 7  $\mu$ l de Tampon 5X Séquenase
- H<sub>2</sub>O qsp 22  $\mu$ l

La détection révèle l'incorporation sur le primer d'un didésoxy GTP, ce qui correspond au résultat attendu, comme visible sur la figure 2, qui montre les résultats obtenus avec deux dilutions différentes des ddNTP (1/200 (a) et 1/400ème (b)).

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mises en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée de la présente invention.

#### Revendications

1°) Procédé de détection et/ou d'identification d'une base nucléotidique spécifique présente sur une séquence d'acide nucléique, caractérisé en ce que :

(1) on hybride la séquence sur laquelle se trouve la base à identifier avec un nucléotide de longueur suffisante pour permettre une hybridation correcte, quelle que soit la température de

réaction, ledit nucléotide s'hybride avec la séquence cible, de manière à ce que son extrémité 3' soit adjacente à la base nucléotidique spécifique à détecter et/ou à identifier ;

(2) on débute la synthèse du brin complémentaire de l'hybride obtenu en (1), - ledit nucléotide servant d'amorce -, en présence :

- d'une polymérase sans action exonucléase 3'5' et

- d'au moins une base nucléotidique modifiée, de manière à être incorporable dans le produit d'extension de l'amorce, ladite incorporation bloquant l'élongation dudit produit d'extension ;

(3) on détecte la base nucléotidique bloquante incorporée par tout moyen approprié, ladite détection permettant d'identifier la base nucléotidique spécifique complémentaire présente sur la séquence cible à analyser.

2°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les bases nucléotidiques bloquantes sont des didésoxynucléotides.

3°) Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que lesdites bases nucléotidiques bloquantes sont marquées de manière appropriée, notamment à l'aide d'un marqueur choisi dans le groupe qui comprend des substances radioactives, des enzymes, des produits chimiques chromophores fluorescents ou chimiluminescents et des anticorps appropriés.

4°) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le marqueur est identique ou différent pour chacune des bases nucléotidiques bloquantes.

5°) Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que lorsque les quatre bases bloquantes sont marquées à l'aide de marqueurs différents, la détection des quatre nucléotides bloquants est avantageusement simultanée.

6°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que lorsque les quatre bases bloquantes sont marquées de manière identique ou bien lorsqu'elles ne sont pas marquées, la détection des quatre nucléotides bloquants est réalisée successivement et/ou séparément.

7°) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'on ose, de manière appropriée, le pyrophosphate formé lors de la réaction de polymérisation, ledit dosage de pyrophosphate permettant de déterminer pour laquelle des bases une réaction de polymérisation s'est produite.

8°) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'on détecte chaque base nucléotidique bloquante marquée.

9°) Kit ou coffret de diagnostic, prêt à l'emploi, pour la mise en œuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il comprend outre les quantités convena-

bles de réactifs et tampons adaptés à la mise en œuvre du procédé ;

- des quantités appropriées d'un nucléotide, servant d'amorce, capable de s'hybrider avec la séquence cible de manière à ce que son extrémité 3' soit adjacente à la base nucléotidique spécifique à détecter ;

- des quantités appropriées de quatre bases nucléotidiques modifiées, de manière à être incorporables dans le produit d'extension de l'amorce tout en bloquant l'élongation dudit produit d'extension ; et

- des quantités appropriées d'une polymérase sans action exonucléase 3'5'.

10°) Kit ou coffret selon la revendication 9, caractérisé en ce que les bases nucléotidiques modifiées sont des didésoxynucléotides.

11°) Kit ou coffret selon la revendication 9 ou la revendication 10, caractérisé en ce que les bases nucléotidiques modifiées sont marquées de manière appropriée, notamment à l'aide d'un marqueur choisi dans le groupe qui comprend des substances radioactives, des enzymes, des produits chimiques chromophores fluorescents ou chimiluminescents et des anticorps appropriés.

12°) Kit ou coffret selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend, en outre, des réactifs appropriés pour le dosage du pyrophosphate.

13°) Application du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, à la détection de la présence de séquences d'acides nucléiques particulières associées à des maladies, telles que maladies génétiques ou maladies cancéreuses, à des infections, ou propres à permettre l'identification d'individus humains, animaux ou végétaux.